

DIE REINDARSTELLUNG VON ARGINASE UND DEREN VERWENDUNG
FÜR DIE BESTIMMUNG VON CARBOXYLENDSTÄNDIGEM ARGININ .

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
ERLANGUNG der DOKTORWÜRDE
der
HOHEN NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
der
LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
zu
MÜNCHEN

(Kurzfassung)

Vorgelegt
von
Otto J a n o w s k y
aus

Tarakan (Borneo)

Juli 1958



DIE REINDARSTELLUNG VON ARGINASE UND DEREN VERWENDUNG
FÜR DIE BESTIMMUNG VON CARBOXYLENDSTÄNDIGEM ARGININ .

INAUGURAL-DISSERTATION

VON

ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE

DER

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

DER

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT

ZU

MÜNCHEN

(Kurzfassung)

Vorgelegt

VON

Otto J a n o w s k y

aus

Tarakan (Bornes)

Juli 1958

Berichterstatter

1.Prof.Dr.Grassmann

2.Prof.Dr.Lynen

Tag der mündlichen

Prüfung: 26.11.58

E i n l e i t u n g

In der vorliegenden Arbeit wird ein Weg gewiesen, carboxylendständiges Arginin zu erfassen. Er beruht auf der Fähigkeit des Enzyms Arginase, die Guanidinogruppen von Arginin unter Bildung von Harnstoff zu versetzen, sofern die Carboxylgruppe dieser Aminosäure frei ist, während eine Substitution an der Aminogruppe den Angriff nicht stört 1)2)3). Der abgespaltene Harnstoff wird nach einer Methode von M.G.ENGEL und F.ENGEL 4) mittels Thydrol gefällt und nach Auflösen des gebildeten Dixanthylharnstoffes in Schwefelsäure colorimetrisch bestimmt.

Diese Methode ist nur dann brauchbar, wenn sie mit einem Arginasepräparat mit strenger Spezifität frei von proteolytischer Aktivität ausgeführt wird. Da die Nacharbeitung bereits bekannter Methoden 5)6)7) zur Darstellung von Arginase nicht zu genügend reproduzierbaren Enzympräparaten führte, die frei von proteolytischen Fremdaktivitäten waren, wurde ein neues Verfahren zur Reinigung des Enzyms ausgearbeitet:

Nach einer Vorreinigung wird das angereicherte Enzym papierelektrophoretisch gereinigt.

Im Folgenden sei die Durchführung der Isolierung geschildert:

Anreicherung des Enzyms und Elektrophorese.

1) Extraktion der Kalbsleber:

1900 g frische Kalbsleber wurden durch den Fleischwolf getrieben und der entstandene Brei anschließend in kleinen Anteilen unter Kühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 5500 ccm einer 0,01 molaren Mangansulfatlösung 2 Std. lang bei +3° gerührt, das pH wurde dabei stets auf pH 7,0 bis pH 7,2 gehalten. Während des Rührens wurden nach und nach 50 ccm Toluol eingerührt. Die Suspension blieb 10 Std. im Kühlraum bei +3° stehen. Nach 10 Std. wurde die Lösung durch ein Filtertuch filtriert.

Lösung A

Volumen : 6000 ccm
N/ccm : 3,6 mg
AE/ccm : 80 8)
AE/mgN : 22
Ges.AE : 480 000

2) Gefriertrocknung des Kalbsleberextraktes.

Der Leberextrakt wurde sofort nach dem Filtrieren eingefroren und gefriergetrocknet. 100 ccm des Extraktes liefern 7-10 g Trockensubstanz. Während der folgenden Arbeitsgänge arbeitet man zweckmäßig so, daß die gesamte Vorreinigung an einem Tag ausgeführt wird und über Nacht jeweils die Elektrophorese erfolgt. Lösungen, die aus irgendwelchen Gründen nicht gleich weiterverarbeitet werden können, werden stets eingefroren.

In der vorliegenden Arbeit wird ein Weg gewiesen, carboxylanaloges Arginin zu erhalten. Es beruht auf der Fähigkeit des Enzyms Arginase, die Guanidino-Gruppe von Arginin unter Bildung von Harnstoff zu versetzen, sofern die Carboxylgruppe dieser Aminosäure frei ist, während eine Substitution an der Amino-Gruppe das Arginin nicht stört (2,3). Der abgespaltene Harnstoff wird nach einer Methode von M.G. BUNGE und F. KUGEL (4) mittels Thioharnstoff nach Auflösen des geklärten Dioxanthylharnstoffes in Schwefelsäure colorimetrisch bestimmt.

Diese Methode ist nur dann brauchbar, wenn sie mit einem Arginasepräparat mit starker Spezifität frei von proteolytischer Aktivität ausgeführt wird. Da die Nacharbeitung bereits bekannter Methoden (5,6,7) zur Darstellung von Arginase nicht zu genügend reproduzierbaren Enzympräparaten führte, die frei von proteolytischen Fremdkontaminationen waren, wurde ein neues Verfahren zur Reinigung des Enzyms ausgearbeitet:

Nach einer Vorreinigung wird das angereicherte Enzym kationenaustauschend getrennt.

Im Folgenden sei die Durchführung der Isolierung geschildert.

Anreicherung des Enzyms und Elektrophorese.

1) Extraktion der Kalbbläuter:

1900 g frische Kalbbläuter wurden durch den Fleischwolf getrieben und der entstehende Brei anschließend in kleinen Anteilen unter Kühlung homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 2500 cc einer 0,01 molarer Mangansulfatlösung 2 Std. lang bei +5° gerührt, das pH wurde dabei stets auf pH 7,0 bis pH 7,2 gehalten. Während des Rührens wurden nach und nach 50 cc Toluol zugeführt. Die Suspension blieb 10 Std. im Kühlraum bei +5° stehen. Nach 10 Std. wurde die Lösung durch ein Filter Tuch filtriert.

Lösung A

Volumen : 6000 cc
N/cm : 3,6 mg
AE/cm : 80 g
AE/gN : 22
Ges. AE : 480 000

2) Gefrierstockung des Kalbbläuterextraktes.

Der Bläuterextrakt wurde sofort nach dem Filtrieren eingefroren und Gefrierstockung. 100 cc des Extraktes lieferten 7-10 g Trockensubstanz. Während der folgenden Arbeitsgänge arbeitet man zweckmäßig so, daß die gesamte Vorrainung an einem Tag ausgeführt wird und über Nacht jeweils die Elektrophorese erfolgt. Lösungen, die aus irgendwelchen Gründen nicht gleich weiterverarbeitet werden können, werden stets eingefroren.

30 g Trockensubstanz wurden in 120 ccm 0,05m Mangansulfatlösung/ 0,05 m Maleinsäure pH 7,0 suspendiert und der unlösliche Anteil mittels der Kältezentrifuge bei +1° und 13 000 U/Min. abzentrifugiert. Die überstehende Lösung ist dunkelrot.

Lösung B

Volumen : 110 ccm
N/ccm : 2 mg
AE/ccm : 220
AE/mg N : 110
GesamtAE: 24 200

3) Pyridinfällung:

Lösung B wird in sechs gleiche Teile geteilt und bei Zimmertemperatur wird jede Teillösung langsam unter gutem Schütteln mit 2 ccm Pyridin (p.a.n.MERCK) versetzt. Es fällt ein dicker brauner Niederschlag der Farbstoffe aus. Nach der Pyridinfällung fügt man sofort in jedes Gläschen 10 ccm 0,05m Mangansulfatlösung/ 0,05m Maleinsäure, schüttelt gut durch und zentrifugiert mit der Kältezentrifuge bei +1° und 13 000 U/Min. den braunen Niederschlag ab. Die überstehende Lösung ist vollkommen klar und farblos bis schwach gelb, trübt sich aber rasch, sobald sie auf Zimmertemperatur kommt.

Lösung C

Volumen : 140 ccm
N/ccm : 0,16 mg
AE/ccm : 164
AE/ccm : 1050
Ges.AE : 23 000

4) Erwärmung.

Die Gesamtmenge der Lösung C wird in 5 gleiche Teile geteilt und im Wasserbad innerhalb von 20 Min. von Zimmertemperatur auf 59° erwärmt. Sobald die Temperatur von 59° erreicht ist, kühlt man die Gläschen und zentrifugiert mit der Kältezentrifuge bei +1° und 13 000 U/Min. den gebildeten Niederschlag ab.

Lösung D

Volumen : 120 ccm
N/ccm : 0,140
AE/ccm : 190
AE/mg N : 1500
Ges.AE : 22 800

5) Acetonfällung.

Lösung D wird in Portionen zu 20 ccm bei +1° mit der doppelten Menge gekühltem Aceton (+1°) versetzt und sofort mit der Kältezentrifuge der Niederschlag abzentrifugiert.

fugiert. Die Fällung wird zwecks Entfernung der Spuren von Aceton für ca. 15 Min. in einem Exikator unter Hochvakuum belassen und in 15 ccm 0,05 m Mangansulfatlösung/0,05 m Maleinsäure gelöst. Der unlösliche Anteil wird abzentrifugiert und verworfen.

Lösung E

Volumen : 15 ccm
N/ccm : 0,57 mg
AE/ccm : 1480
AE/mg N : 2600
Ges.AE : 22200

6) Methanolfällung.

Lösung E wird auf $+1^{\circ}$ abgekühlt und mit der gleichen Menge Methanol (0°) versetzt. Der gebildete Niederschlag wird bei 0° mit der Kältezentrifuge bei 13000 U/Min. abzentrifugiert. Der Niederschlag wird zur Entfernung von Methanol für 10 Min. im Exikator unter Hochvakuum belassen und in 10 ccm Pyridinpuffer (vgl. Punkt 7) dieser Vorreinigung) (mit Mn^{++}) gelöst. Der geringe nicht lösliche Anteil wird abzentrifugiert und verworfen.

Lösung F

Volumen : 10 ccm
N/ccm : 0,720 mg^{*)}
AE/ccm : 2150
AE/mg N : 3000
Ges.AE : 21 500

7) Die elektrophoretische Trennung.

Lösung F wird eingefroren, bei Bedarf wird ihr die Lösungsmenge entnommen, die dem Trennbogen zugeführt wird. Die automatische Pumpe, die die Lösung dem Trennbogen zuführt, wird so eingestellt, daß sie innerhalb von 10 Std. 3 ccm der Lösung F fördert. Als Puffer wird Pyridinpuffer pH 6,9 angewandt mit folgender Zusammensetzung:

75 ccm Pyridin (p.a.n. MERCK)
1,5 ccm Eisessig (p.a.n. MERCK)
4425 ccm Wasser

Daten: 600 V, 15 mA (Elphor Va), Trennpapier Schleicher & Schüll 604 L.

Es ist sehr zweckmäßig, die elektrophoretische Trennung in einem Kältelabor bei $+3^{\circ}$ durchzuführen.

+) Bei allen Lösungen, die Pyridin enthalten, wurde vor der Stickstoffbestimmung das Pyridin durch Dialyse entfernt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Nur der Anodenflüssigkeit und der Wanne der Apparatur werden zusätzlich Mangan-II-Ionen zugesetzt. 5 Liter Puffer enthalten 10 g Mangansulfat. Nach der elektrophoretischen Trennung findet sich das Enzym in den Fraktionen 20 und 21. Nach Testung der Gläschen werden die Fraktionen eingefroren, wobei keine Gummiverschlüsse für die Gläschen verwendet werden dürfen und gefriergetrocknet. Die Heizung der Gefriertrocknung wurde dabei auf 45° gestellt.

Der Inhalt der Fraktionen 20, 21 beträgt 29,5 mg.

AE/mg : 540

N/mg : 0,1

AE/mgN: 5400

Ges.AE: 16 000

Das so erhaltene Enzympräparat ist vollkommen ungefärbt und in Wasser sehr leicht löslich.

Das gewonnene Enzym wurde papierelektrophoretisch bei verschiedenen pH-Werten, in der Tiseliusapparatur bei pH 8,6 und in der Ultrazentrifuge als einheitlich befunden. Die elektrophoretische Beweglichkeit bei pH 8,6 betrug $3,1 \text{ ccm V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, die Sedimentationskonstante errechnete sich zu 3,84 S.

Mit Hilfe spezifischer, meist kolorimetrischer Enzymtests ließen sich keine Begleitenzyme nachweisen. Der isoelektrische Punkt wurde papierelektrophoretisch bei pH 4,05 gefunden.

Mit diesem Enzympräparat wurden nun an Peptiden, die einem tryptischen Hydrolysat von Prokollagen entstammten, Bestimmungen von carboxylendständigem Arginin mit gutem Ergebnis durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- 1) S. Edlbacher und H. Burchard H 194, 69 (1931)
- 2) H.O. Calvery und W.D. Block, Il. of biol. Chem. 107, 155 (1934)
- 3) M. Bergmann und J.S. Fruton, Am. Rev. Biochem. 10, 31 (1946)
Ref. C. 1941 II 2334
- 4) M.G. Engel und F. Engel, J. biol. Chem. 167, 535 (1946)
- 5) S.J. Bach, Nat. 158, 376 (1946)
- 6) D.M. Greenberg, A.O. Roholt jr. und A.E. Bagot, Arch. of Biochem. and Biophys. 62, 446 (1956)
- 7) O.A. Roholt jr. und D.M. Greenberg, Arch. of Biochem and Biophys. 62, 454 (1956)
- 8) D.D. van Slyke und R.M. Archibald, J. Biol. Chem. 165, 293 (1946)

LEBENS LAUF :

Ich, Otto Janowsky, wurde am 11.8.26 als Sohn des Tropenarztes Dr.phil et Dr.med.Robert Janowsky und seiner Ehefrau Maria geb. Kopitsch in Tarakan auf Borneo (Holländisch Ost-Indien) geboren. Mein Vater kam als Expeditionsteilnehmer nach Holländisch-Indien und war später dort als Leiter eines Krankenhauses tätig.

Nach Besuch von 2 Klassen der holländischen Volksschule in Soebandjerigi auf Sumatra trat ich 1935 in die deutsche Volksschule in Görkau (Sudetenland) ein, nachdem meine Eltern in ihre ursprüngliche Heimat zurückgekehrt waren. 1936 trat ich in die Oberschule für Jungen in Komotau (Sudetenland) ein. 1943 wurde ich zum Luftwaffenhelferdiens nach Brüx einberufen und erhielt vor meiner Einberufung zur Wehrmacht (Feber 1944) den Vorsemesterbescheid der Oberschule für Jungen in Komotau. Den Wehrdienst verbrachte ich in Holland und in Italien bei der 4.Fallschirmjägerdivision. Von 1945 bis 1947 befand ich mich in alliierter Kriegsgefangenschaft in Süditalien. Nach der Flucht aus der Gefangenschaft legte ich 1947 an der phil.theol. Hochschule Regensburg das Abitur für Kriegsteilnehmer ab und begann 1950 mit dem Chemiestudium an der gleichen Hochschule. 1955 legte ich an der Universität München das Diplomhauptexamen ab. Die Diplom- und Doktorarbeit führte ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung aus.

Otto Janowsky.

